CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES AFFINITÉS ENTRE *HETEROBASIDION ANNOSUM* (FR.) BRES. ET LES *BONDARZEWIACEAE**

par K. GLUCHOFF-FIASSON, A. DAVID & B. DEQUATRE**

RÉSUMÉ. – La présence d'éléments «sulfo-aldéhydiques positifs» chez *Heterobasidion annosum* (laticifères et pseudocystides dans les basidiomes, laticifères dans le mycélium en culture) est signalée pour la première fois. Cette particularité, s'ajoutant aux caractères des spores, rapproche le genre *Heterobasidion* du genre *Bondarzewia* et permet de l'intégrer dans un ensemble d'espèces ayant des composants biochimiques communs.

SUMMARY. - The occurrence of «sulfo-aldehydic positive» elements (laticifers and pseudocystidia in the basidiocarps, laticifers in the mycelium) is here reported for the first time. This peculiarity, together with sporal characters, draws the genus *Heterobasidion* closer to the genus *Bondarzewia* and allows to integrate it in a series of species sharing common biochemical components.

Heterobasidion annosum est une espèce très commune en Europe, facilement reconnaissable et cependant assez peu étudiée par les mycologues contemporains. Ceci explique par exemple que les spores furent décrites comme lisses et non amyloïdes jusqu'en 1973, date à laquelle KELLER montra qu'elles étaient aspérulées et amyloïdes.

En 1979 STALPERS publia un article intitulé «*Heterobasidion (Fomes) annosum* and the *Bondarzewiaceae*». D'après cet auteur, le genre *Heterobasidion* doit être placé dans la famille des *Bondarzewiaceae*. En effet il présente avec le genre *Bondarzewia* plusieurs caractères communs : 1) spores ornementées et

---

* Recherches chimiotaxinomiques sur les Champignons, 49; 48 : J.L. FIASSON, *Synthetic contribution to the phylogenetic taxonomy of European poroid Hymenochaetaceae (Aphyllophorales), Karstenia*, à paraître.

** Laboratoire de Mycologie associé au C.N.R.S. n° 44, Département de Biologie Végétale, Université de Lyon 1, 43 Bd du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France.

CRYPTOGAMIE, MYCOLOGIE *(Cryptog., Mycol.)*, TOME 4 (1983).

amyloïdes; 2) système d'hyphes dimitique; 3) cloisons bouclées rares mais présentes; 4) forme conidienne (Spiniger) connue dans *H. annosum*, *H. insulare* et *B. berkeleyi*; 5) pourriture blanche et production de laccase par le mycélium en culture; 6) présence dans ces deux genres d'espèces parasites.

L'idée d'une telle affinité était en mesure de surprendre maints mycologues de terrain. *H. annosum* et *B. montana* sont en effet deux espèces morphologiquement bien différentes : la première rappelle parfois *Fomitopsis pinicola*, la seconde *Polyporus giganteus*.

Les études biochimiques apportent aujourd'hui des arguments supplémentaires en faveur de l'affinité des genres *Heterobasidion* et *Bondarzewia*. Le principe responsable de la réaction sulfo-aldéhyde + (s. a. +) observée dans les laticifères de *B. montana* (A.D. cité *in* KUHNER 1980, p. 643) a été caractérisé récemment (GLUCHOFF-FIASSON et KUHNER, 1982) comme étant un sesquiterpénoïde à squelette marasmane : le stéaryl-vélutinal **1** (FAVRE-BONVIN et coll., 1982).

OR, O, O

1 R = stéaryl

2 R = CH_3

Or parmi les principaux dérivés de ce composé très instable (DE BERNARDI et coll., sous presse) il est deux furanosesquiterpènes également s. a. + que NOZOE et coll. (1971) ont isolés de cultures de *H. insulare*; ce même groupe de travail y a par la suite caractérisé plusieurs métabolites mineurs à squelettes protoilludane et marasmane et montré qu'ils étaient reliés biogénétiquement avec les précédents (NOZOE et coll., 1977). L'ensemble de ces données incitait évidemment à explorer la réaction des *Heterobasidion* aux sulfo-aldéhydes : de fait *H. annosum* présente des laticifères s. a. + dont certains se relèvent dans l'hyménium sous forme de pseudocystides.

Les descriptions d'*Heterobasidion annosum* se retrouvent dans tous les ouvrages de mycologie classique auxquels nous renvoyons nos lecteurs. Nous ne développerons dans ce travail que les compléments inédits portant aussi bien sur la morphologie du carpophore que sur la description des mycéliums en culture, la sexualité, la caractérisation des substances responsables de la réaction s. a. + des laticifères ou pseudocystides. Nous donnerons ces mêmes compléments d'information au sujet de *H. insulare* (culture), *Bondarzewia montana* (carpophore et culture), *B. berkeleyi* (carpophore et culture).

LISTE DES ÉCHANTILLONS ÉTUDIÉS

(*a* : étude morphologique du basidiome; *b* : étude du mycélium; *c* : étude de la réaction s. a. + du basidiome; *d* : étude de la réaction s. a. + du mycélium) :

Bondarzewia berkeleyi (Fr.) Bond. et Sing.: – C.B.S. Baarn 312 36 (*b, d*); – n° 4482, Herbier J.L. LOWE, sur *Quercus*, Mt Pisgah, Asheville, Nord Caroline, U.S.A., 20 juillet 1950 (*a*).

Bondarzewia montana (Fr.) Sing. : – LY-AD 512, exposition mycologique de Pau, Pyrénées-Atlantiques, octobre 1967 (*a*); – LY-AD 4132, sur souche d'*Abies*, Forêt de Chaux, Jura, leg. & det. CAVET, septembre 1981 (*a, c, d*); – LY-AD 4199, sur souche d'*Abies* forêt de Plitvice, Yougoslavie, leg. TORTIC (*a, b, d*); – PB 81, sur souche d'*Abies*, Bois du Mont, Puy-de-Dôme, septembre 1981 (*c*).

Heterobasidion insulare (Murr.) Ryv. : – C.B.S. Baarn 451 76 (*b, d*).

Heterobasidion annosum (Fr.) Bres. : – LY-AD 2031, Kaboul, Afghanistan, leg. LALANDE, det. A. DAVID, 1976 (*b, d*); – LY-AD 3055, sur souche de *Pinus maritima*, Liorac-sur-Louyre, Dordogne, leg. & det. A. DAVID, octobre 1972 (*b, d*); – LY-AD 4278, sur souche de *Picea excelsa*, col de Cuvillat, Ain, leg. & det. A. DAVID, mai 1982 (*a, b, c, d*); – LY-AD 4378, sur souche de *Picea excelsa*, Massif du Grand-Colombier, Ain, leg. J. BOZONNET, août 1982 (*a, c*).

COMPLÉMENT A L'ÉTUDE MORPHOLOGIQUE DES BASIDIOMES

Heterobasidion annosum

Un caractère particulier de *H. annosum* encore non décrit à ce jour est la présence dans les dissépiments d'éléments sulfo-anisiques + : dans la région sous-hyméniale on observe de nombreuses hyphes à contenu huileux, réfringent, qui se redressent en direction de l'hyménium pour venir s'insérer entre les basides où elles constituent ainsi des pseudocystides. Le contenu de ces hyphes est coloré en bleu foncé par le réactif sulfo-anisique, ce qui facilite leur observation et permet de suivre leur évolution jusque dans l'hyménium. Par la nature et l'aspect huileux de leur contenu ces pseudocystides s'apparentent à des gloeocystides. Ce contenu évolue avec le temps : dans les carpophores jeunes et frais la plupart des pseudocystides renferment d'innombrables petites gouttelettes (0.3 à 1.5 µm de diamètre) réfringentes et très serrées; avec l'âge ces gouttelettes se fusionnent en une masse réfringente unique, laquelle peu à peu se fractionnera pour finalement disparaître dans les pseudocystides les plus anciennes. De même la partie terminale de la pseudocystide change d'aspect avec l'âge : chez les jeunes, remplies de gouttelettes, elle est assez régulière avec une extrémité arrondie; chez les pseudocystides plus âgées, elle devient irrégulière en se rétrécissant plus ou moins et porte très souvent une ou deux (exceptionnellement trois) papilles terminales (Fig. 1 A et B). Les gouttelettes des laticifères et pseudocystides ne sont visibles que sur des carpophores très frais : la dessiccation provoque leur fusion en une masse réfringente unique; 24 à 48 heures après la récolte, la disparition est totale. Dans les carpophores jeunes ou à maturité, les pseudocystides ne font jamais saillie hors de l'hyménium, restant toujours plus ou moins en retrait des basides adultes; par contre dans les carpophores âgés où les basides sont soit collapsées soit (celles de nouvelles générations) très jeunes, les pseudocystides se redressent au-dessus de la surface hyméniale et sont alors bien repérables.

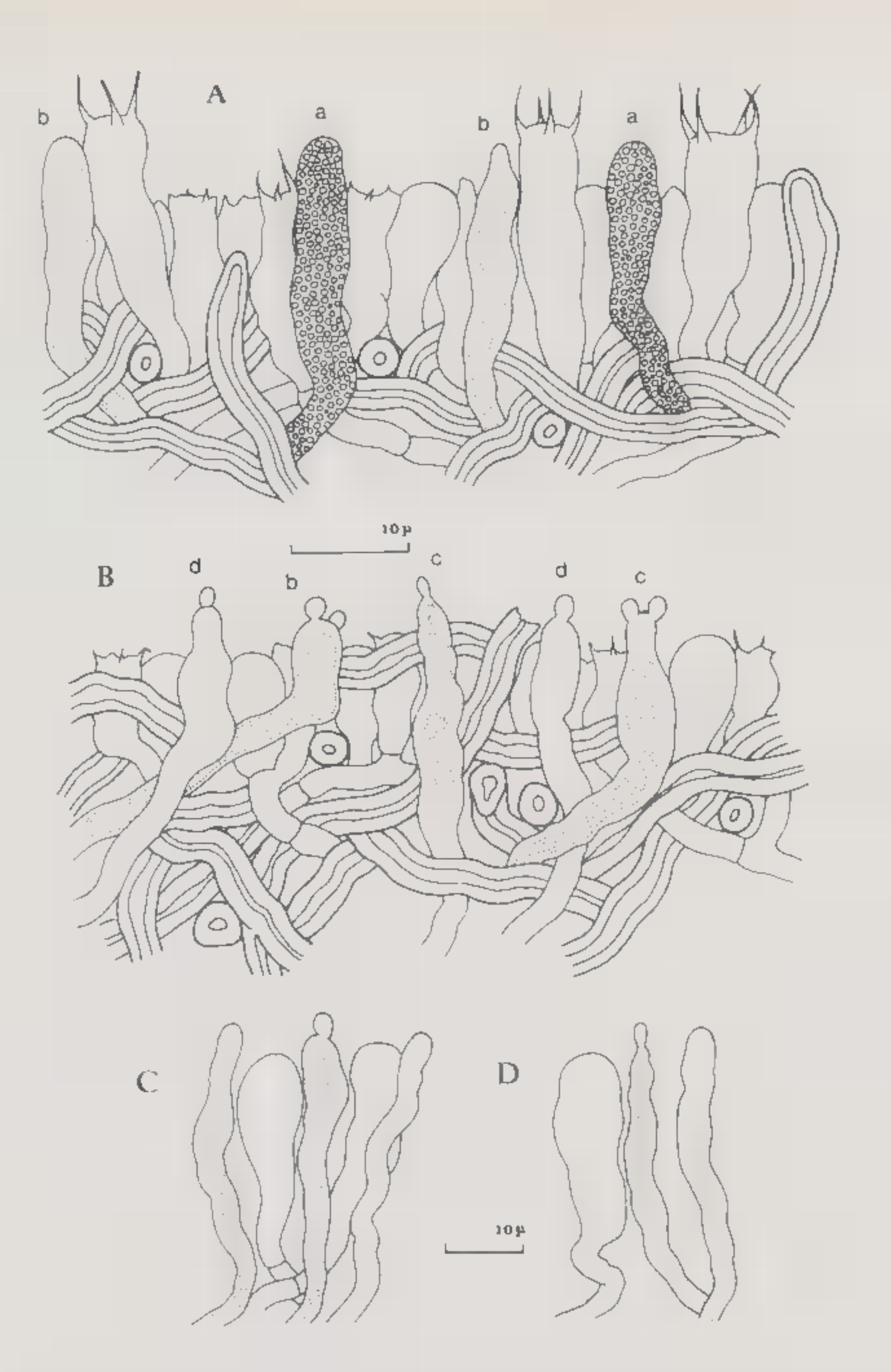


Fig. 1. - A. Pseudocystides d'*Heterobasidion annosum* observées dans un hyménium jeune (carpophore frais). - récolte LY-AD 4378. – B. Pseudocystides d'*Heterobasidion annosum* observées dans un hyménium âgé - récolte LY-AD 4299 : a, b, c, d = stades successifs d'évolution des pseudocystides. - C. Pseudocystides et basidioles observées chez *Bondarzewia montana* - récolte LY-AD 512. – D. Pseudocystides et basidiole observées chez *Bondarzewia berkeleyi* - exsiccata herbier LOWE n° 4482.

Conséquence probable de la présence de sesquiterpènes, la chair d'*H. annosum* est légèrement poivrée, cette sensation n'apparaissant qu'après un certain moment de mastication.

Bondarzewia montana et ***B. berkeleyi***

Chez ces deux espèces, laticifères et pseudocystides se retrouvent au niveau de la trame et dans l'hyménium (Fig. 1, C et D).

COMPLÉMENT A L'ÉTUDE DU MYCÉLIUM EN CULTURE

Heterobasidion annosum

• Spores, germination et mycélium monosperme. - Les spores binucléées germent en 1 ou 2 jours : elles donnent naissance à un mycélium dont les articles sont cénocytiques, l'article terminal renfermant de 14 à 30 noyaux, les articles intercalaires de 3 à 13 noyaux; ci-dessous quelques relevés faits à partir de l'article terminal : 30-11-3-10-8-7-6 ...; 24-13-4-3-10-5 ...; 22-5-4-5-4-2 ...; 14-6-4-2-5... Aucune boucle n'est jamais observée dans les mycéliums monospermes.

• Sexualité. - D'après CHASE et ULLRICH (1981) *H. annosum* serait bipolaire : les confrontations faites à partir de 10 monospermes de la récolte 4278 nous ont en effet permis de distinguer deux pôles; une vérification avec un plus grand nombre de monospermes serait souhaitable. Signalons que dans les confrontations positives il se développe au centre de la boîte, entre les deux monospermes, une zone beaucoup plus colorée, brune, atteignant parfois 2 à 3 cm de largeur.

• Mycélium polysperme. – Description : nous ne donnerons ici que des compléments aux descriptions antérieures (STALPERS, 1978).

- Les hyphes génératrices, irrégulières, sont à paroi mince, à l'exception d'hyphes âgées pouvant présenter un fort épaississement pariétal accompagné de nombreuses cloisons de retrait. Les hyphes montrent à la fois des cloisons simples et des cloisons bouclées. Les boucles sont assez fréquentes sur les gros axes mycéliens (diamètre : 6-10 µm) mais bien plus rares sur les hyphes de calibre faible à moyen (diamètre : 1,5-4 µm). Par ailleurs la fréquence des boucles peut varier beaucoup selon la souche étudiée : LY-AD 3055 présente un grand nombre d'hyphes de fort calibre à boucles nombreuses; au contraire dans le mycélium secondaire de la récolte 4278, constitué essentiellement d'hyphes de faible et moyen calibre, les boucles sont peu nombreuses et peuvent facilement passer inaperçues.

- Certaines hyphes génératrices se distinguent par un contenu très particulier constitué d'innombrables gouttelettes réfringentes se colorant en bleu foncé avec le réactif sulfo-anisique : ces hyphes correspondent aux laticifères observés dans le basidiome. Avec l'âge les gouttelettes se fusionnent en amas réfringents

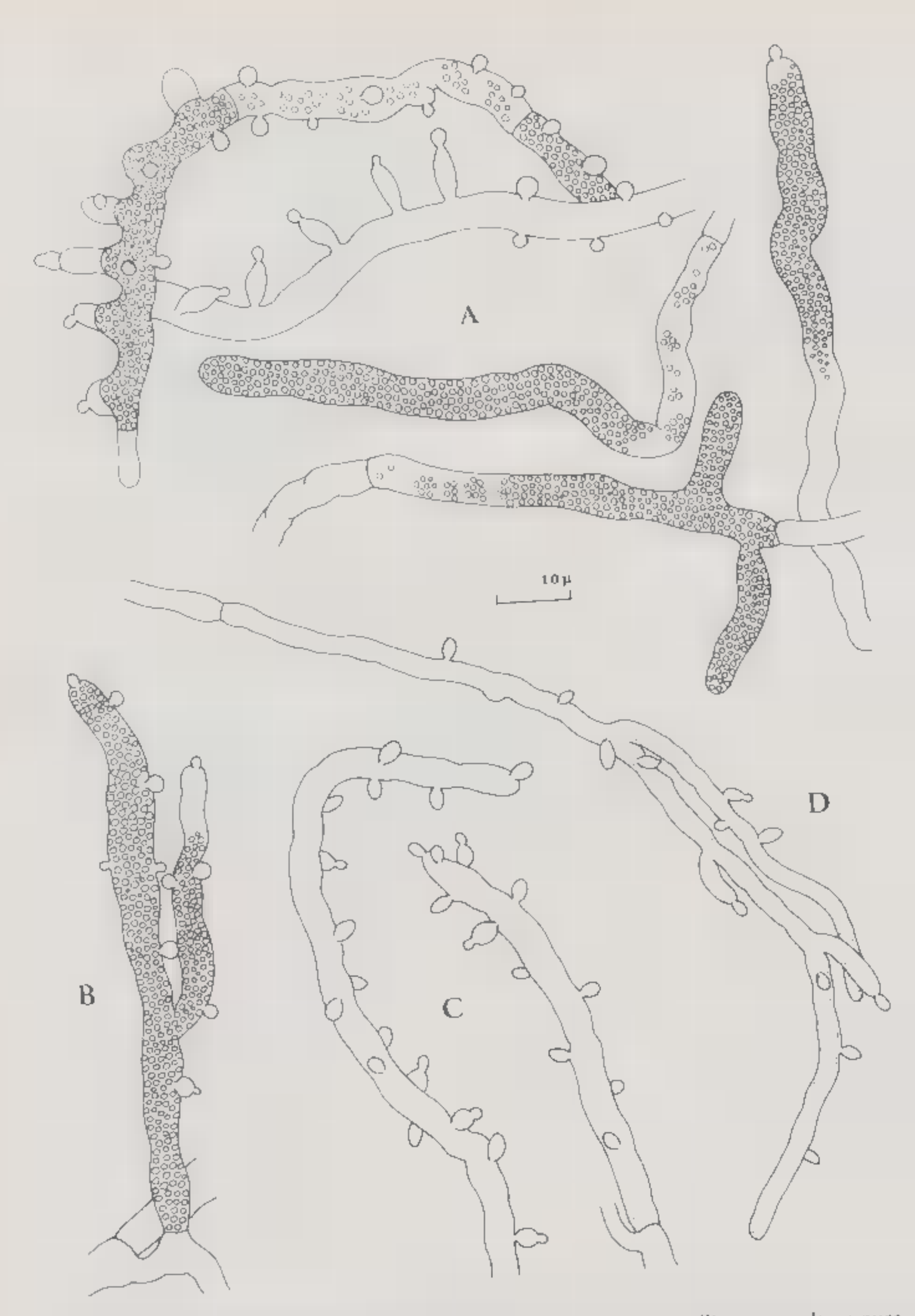


Fig. 2. – Hyphes oléifères sulfo-aldéhydes + présentes dans les myléliums en culture pure. On observe ici que les hyphes sont soit guttulées, soit à contenu homogène résultant de la fusion des gouttelettes, soit entièrement vides. – A. *Heterobasidion annosum* - récolte LY-AD 4278. B. *Heterobasidion insulare* - souche C.B.S. 451 76. – C. *Bondarzewia montana* - récolte LY-AD 4199. - D. *Bondarzewia berkeleyi* - souche C.B.S. 312 36.

informes qui se réduisent peu à peu pour finalement disparaître : à ce stade, il se forme souvent des cloisons de retrait. Ces hyphes sulfo + portent des papilles caractéristiques jamais observées sur les hyphes ordinaires; ces ornements sont particulièrement nombreux chez les hyphes s. a. + âgées, plus rares à absents chez les hyphes jeunes (Fig. 2 A).

- Les fibres, peu nombreuses, à paroi très épaissie, sont irrégulières, souvent tortueuses et fréquemment ramifiées.

- Nombre de noyaux par article : bouclés ou non, tous les articles sont cénocytiques, particulièrement le terminal qui, comme le montrent les relevés ci-après (effectués sur la récolte 4278), est beaucoup plus riche en noyaux que dans le mycélium monosperme : 101-6-9-10-13-14 ...; 85-28-2-3-4-5-...; 46-11-5-13-10 ...

*Cycle nucléaire. La présence de boucles rares et inconstantes dans le polysperme alors que les monospermes en sont dépourvus, et les articles terminaux plus cénocytiques dans le polysperme que dans les monospermes, tendent à prouver que l'espèce est holocénocytique hétérothalle.

Heterobasidion insulare, *Bondarzewia berkeleyi* et *B. montana*

Nous n'avons pas eu la possibilité d'obtenir de sporées de ces trois espèces et n'avons donc aucune indication sur la cytologie de leurs mycéliums primaires.

*Mycéliums secondaires : les hyphes génératrices d'*H. insulare* et de *B. montana* présentent des boucles rares, boucles qui n'ont pu être retrouvées chez *B. berkeleyi*.

- Dans tous les cas nous avons retrouvé des hyphes sulfo + porteuses de papilles, identiques à celles présentes dans le mycélium de *H. annosum* (Fig. 2, B, C, D).

- Les articles des mycéliums secondaires de ces trois espèces sont cénocytiques; ci-dessous quelques relevés faits à partir de l'article terminal : *H. insulare* (C.B.S. 451 76) : 21-4-4-5-3-5-5-2 ...; 33-2-2-4-2-1 ...; 49-3-3-4-3-1-6-1 ... *Bondarzewia berkeleyi* (C.B.S. 312-36) : 25-20-24-22-25-5-11-8 ...; 46-9-12-11-6-10 ...; 51-14-6-8-4-13 ... *B. montana* (LY-AD 4199) : 62-13-12-5-6-10 ...; 85-11-8-8-13-2-9 ...; 136-10-8-10-9 ...

CARACTÉRISATION DES SUBSTANCES RESPONSABLES DE LA RÉACTION S. A. +.

Les basidiomes, choisis pour leur parfait état de fraîcheur, de même que les mycéliums recueillis en phase exponentielle de croissance, sont immédiatement congelés.

Le matériel est broyé dans le dichlorométhane, en plusieurs étapes chacune assez brève pour interdire la décongélation et séparées par des retours à 20°C. L'eau éventuellement présente dans le filtrat est éliminée par congélation; l'ex-

trait anhydre est évaporé à sec à température ambiante et repris par l'acétone.

Le stéaryl-vélutinal 1 est identifié par comparaison chromatographique avec l'échantillon original isolé de *Lactarius velutinus* Bert., non seulement à l'état naturel mais également après méthanolyse douce (conversion en 2) (FAVRE-BONVIN et coll., 1982); le Tableau décrit les trois systèmes chromatographiques utilisés.

TABLEAU

Caractéristiques chromatographiques du stéaryl-vélutinal
(ester naturel 1 et produit de méthanolyse 2)

Composé		1	2
R_f (*)	«sur alumine» (**)	0,59	0,35
	«sur silice» (***)	0,47	0,24
Volume d'élution C.L.H.P. (ml) (****)		19^a	14^b

(*) : Tache bleu-violet sombre immédiatement après pulvérisation d'une solution de vanilline (2,5 g) dans H_2SO_4 - H_2O 1.1 (80 ml).
(**) : C.C.M. Al_2O_3 «DCF 60 Merck»; hexane acétate d'éthyle 20:1.
(***) : C.C.M. SiO_2 «DCF 60 Merck»; hexane-acétate d'éthyle 10:1.
(****) : C.L.H.P. «RP 18 Merck»; méthanol-eau (^{a} : 98:2, ^{b} 70:30), 1,5 ml. min^{-1}; détection réfractométrique.

Dans tous les cas (et qu'il s'agisse du basidiome ou du mycélium) la réaction bleue à la sulfo-vanilline à froid sur chromatogramme est le fait exclusif du stéaryl-vélutinal. Parmi les taches mineures correspondant aux produits de dégradation du sesquiterpénoïde, un composé assez polaire réagissant en rose vineux n'est sans doute pas artéfactuel.

CONCLUSION

La conjonction des caractères : spores ornementées amyloïdes et réaction s. a. + liée à la présence d'un même sesquiterpène, se retrouve dans de nombreux genres et familles d'hyménomycètes morphologiquement très différents (*Russulaceae*, *Bondarzewiaceae*, *Lentinellus*, *Auriscalpium*, certains *Gloeocystidiellum*, *Dichostereum*, *Amylocystidiellum*) et a fait l'objet de plusieurs publications (ROMAGNESI, 1944, 1964; BOIDIN, 1958; KUHNER, 1980, et tout récemment GLUCHOFF-FIASSON et KUHNER, 1982). Nous ne pouvons que suivre la conclusion de ces auteurs en pensant que le genre *Heterobasidion* s'intègre fort bien dans cet ensemble naturel par enchaînement et ce, comme l'avait indiqué STALPERS, au sein des *Bondarzewiaceae*.

BIBLIOGRAPHIE

BOIDIN J., 1958 — *Essai biotaxinomique sur les Hydnés résupinés et les Corticiés. Rev. Myc.*, HS 6, 387 p.

CHASE T.E. & ULLRICH R.C., 1981 — Sexuality and dispersal patterns of *Heterobasidion annosum. Mycol. Soc. Amer. Newsletter* 32, 29.

DE BERNARDI M., VIDARI G., VITA-FINZI P. & GLUCHOFF-FIASSON K., 1982 Biogenesis-like conversion of marasmane to lactarane and secolactarane skeleton. *Tetrahedron Letters*, sous presse.

FAVRE-BONVIN J., GLUCHOFF-FIASSON K. & BERNILLON J., 1982 — Structure du stéaryl-vélutinal, sesquiterpénoïde naturel de *Lactarius velutinus* Bert. *Tetrahedron Letters* 23 : 1907-1908.

GLUCHOFF-FIASSON K. & KUHNER R., 1982 — Le principe responsable du bleuissement au réactif sulfo-vanillique des cystides ou laticifères de divers Homobasidiomycètes : intérêt taxinomique. *C. R. Acad. Sc. Paris* 294 : 1067-1071.

KELLER J., 1973 — Ultrastructure de la paroi sporale de *Heterobasidion annosum. Schw. Z. Pilzk.* 86 : 97-99.

KUHNER R., 1980 — *Les Hyménomycètes Agaricoïdes*. Soc. Linn., Lyon, 1027 p.

NOZOE S., MATSUMOTO H. & URANO S., 1971 — The structure of new sesquiterpenes from Basidiomycetes. *Tetrahedron Letters* 33 : 3125-3226.

NOZOE S., KOBAYASHI H., URANO S. & FURUKAWA J., 1977 — Isolation of Δ^6-protoilludene and the related alcohols. *Tetrahedron Letters* 16 : 1381-1384.

ROMAGNESI H., 1944 — La cystide chez les Agaricacées. *Rev. Myc.* 9, suppl., 1-21.

ROMAGNESI H., 1964 — Sur deux réactions microchimiques associées chez certains Basidiomycètes supérieurs. *Rev. Myc.* 29 : 93-100.

STALPERS J.A., 1978 — Identification of wood-inhabiting Aphyllophorales in pure culture. *Studies in Mycol., Baarn* 16 : 1-248.

STALPERS J.A., 1979 — *Heterobasidion (Fomes) annosum* and the *Bondarzewiaceae. Taxon* 28 : 414-417.